# Zur Methodik der Darstellung von γ-Glutaminyl-peptiden

a) Über die Darstellung von Alkalisalzen der Aminosäuren

b) Über den γ-Glutaminyl-glycin-ester

Von der

Technischen Hochschule zu Breslau

zur Erlangung der Würde eines Doktor-Ingenieurs

genehmigte

## Dissertation

Vorgelegt von

**Dipl.-Ing. Renate Guttmann**
aus Bolkenhain

Referent: Prof. Dr. phil. F. Straus
Korreferent: Prof. Dr. phil. F. Ehrlich

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Juli 1931

Verlag von WALTER DE GRUYTER & CO., Berlin und Leipzig
1 9 3 2

*26377

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Sonderdruck aus
Ber. chem. Gesellschaft, 63. Band, S. 1726 (1930)
Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie, 204. Band, S. 1 (1932)

Druck von Metzger & Wittig in Leipzig 112

# Über die Darstellung von Alkalisalzen der Amino-säuren

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543117_0119

Bei dem synthetischen Aufbau von bestimmten Peptiden, über die demnächst berichtet werden soll, ergab sich die Notwendigkeit, Alkalisalze von Amino-säuren absolut rein und wasser-frei zu verwenden. Nun sind in der Literatur Alkalisalze der Amino-säuren nur spärlich erwähnt, ein Ergebnis, das anfänglich sehr überrascht, besonders wenn man die so zahlreichen Angaben über Komplexverbindungen der Amino-säuren mit Schwermetallen, Löslichkeits-Beeinflussung durch Neutralsalze usw. berücksichtigt. Diese vorhandene Lücke wird aber sofort verständlich, wenn man sich die besondere Eigenart der Amino-säuren vor Augen hält:

Aus wäßrigen Lösungen lassen sich nach den Untersuchungen von Th. Curtius[1]) die Alkalisalze in der üblichen Weise nicht darstellen. Zur Freilegung des Carboxyls der Amino-säuren sind wegen der bekannten inneren Salzbildung besondere Maßnahmen notwendig. Bei der alkalimetrischen Titration der Amino-säuren kann dies nach S. P. L. Sörensen[2]) durch Zusatz von Formalin erreicht werden, oder man verwendet nach R. Willstätter und E. Waldschmidt-Leitz[3]) hochkonzentrierten Alkohol als Lösungsmittel. Das von wäßrigen Lösungen abweichende Verhalten der Amino-säuren in Alkohol ist nun auch zur Darstellung der wenigen, bisher in der Literatur erwähnten Alkalisalze der Monocarbonsäuren benutzt worden. Durch Umsatz mit Natriumäthylat haben E. Abderhalden und M. Guggenheim[4]) das Dinatriumsalz des *l*-Thyrosins und A. Fodor und M. Weitzmann[5]) das Natriumsalz des *d, l*-Leucins erhalten. Von den Autoren sind aber keine analytischen Zahlen gegeben worden, so daß die Reinheit bzw. Einheitlichkeit der Salze nicht ersichtlich ist.

Von einigen Amino-monocarbonsäuren wurden auf dem eben angegebenen Wege von uns die Natriumsalze hergestellt und analysiert. Das Ergebnis dieser Nachprüfung zeigte aber eindeutig, daß reine Produkte so nicht gewonnen werden können. Als Maßstab dafür sollen weniger die Abweichungen des Gehaltes an Alkali und Stickstoff angesehen werden, als die gefundenen Werte für den Amino-Stickstoff nach van Slyke[6]). Beim Natriumsalz des Leucins war der Amino-Stickstoff ca. 90% des Gesamt-Stickstoffs, beim Alanin nur noch 70%. Die einfachste Annahme zur Erklärung dieser Differenz wäre wohl die einer teilweisen Bildung von Diketo-piperazinen. Diese Annahme reicht aber bestimmt nicht aus, um die Beobachtungen bei der Einwirkung von Natriumäthylat auf Glykokoll zu erklären. In diesem Falle muß eine mehr oder weniger weitgehende Zersetzung in anderer Richtung angenommen werden, die sich in der Bildung von Methylamin zeigt.

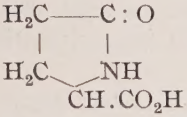
Bei der Salzbildung von Amino-dicarbonsäuren sind die Verhältnisse entsprechend. E. Abderhalden und K. Kautzsch[7]) konnten aus wäßrigen

---

[1]) Journ. prakt. Chem. [2] **26**, 160 [1882].
[2]) Ztschr. physiol. Chem. **63**, 27 [1909], **64**, 120 [1910], **71**, 458 [1911], **75**, 363 [1911]
[3]) B. **54**, 2988 [1921]. [4]) Ztschr. physiol. Chem. **65**, 53 [1910].
[5]) Ztschr. physiol. Chem. **154**, 290 [1926]. [6]) B. **43**, 3170 [1910].
[7]) Ztschr. physiol. Chemie **64**, 447 [1910].

Lösungen nur das Mononatriumsalz der *d*-Glutaminsäure (I) erhalten, die Darstellung des Dinatriumsalzes (II) gelang auf diesem Wege nicht. Nach den Angaben von Abderhalden und Kautzsch wird das Mononatriumsalz mit 2% Krystallwasser erhalten, das im Vakuum bei 100° aber entfernt werden kann. Beim Nacharbeiten dieser Vorschrift wurden auch Produkte erhalten, deren Gehalt an Alkali und Stickstoff dem wasser-freien Salz entsprach, aber nur bei kleinen Ansätzen und bei langem Trocknen. Bei größeren Ansätzen für präparative Zwecke wurden erhebliche Abweichungen beobachtet. Selbst nach langem Trocknen bei 100° über Phosphorpentoxyd war keine Gewichtskonstanz zu erreichen, dazu wurde ständig parallel der Gewichtsabnahme eine Abnahme des Amino-Stickstoffs, verglichen mit dem Gesamt-Stickstoff, beobachtet. Der theoretische Wert für den Stickstoff wurde nie erreicht. Berücksichtigt man den leichten Übergang der Glutaminsäure in α-Pyrrolidon-α'-carbonsäure (III), so muß als einfachste Annahme zur Erklärung der beobachteten Differenz zwischen Gesamt- und Amino-Stickstoff die Umwandlung des glutaminsauren Natriums in das Natriumsalz der α-Pyrrolidon-α'-carbonsäure angesehen werden. Aus dem beobachteten Resultat bei kleinen Ansätzen ergibt sich aber die Einschränkung, daß diese Umwandlung nur bei Anwesenheit von restlichem Krystallwasser anzunehmen ist. Denn kann das Krystallwasser schnell entfernt werden, wie dies z. B. bei kleinen Ansätzen durch Ausbreiten in dünner Schicht erfolgt, so schließt die beobachtete Gewichtskonstanz die Annahme von Veränderungen des wasser-freien Salzes aus.

I. $NaO_2C.CH(NH_2).CH_2.CH_2.CO_2H$ II. $NaO_2.CH(NH_2).CH_2.CH_2.CO_2Na$

III. 

IV. $(NH_4).O_2C.CH(NH_2).CH_2.CH_2.CO_2H$

V. $(NH_4)O_2C.CH.(NH_2).CH_2.CO_2H$

Wenn nun auch die ebenerwähnten Methoden zur Darstellung von reinen und wasser-freien Salzen der Amino-säuren durchweg nicht geeignet waren, so haben die dabei gewonnenen Erfahrungen doch einen Hinweis zur Lösung der Frage gegeben; denn als gemeinsame Ursache der störenden Nebenreaktionen muß wohl mit größter Wahrscheinlichkeit die Anwendung höherer Temperatur im Laufe der Darstellung angesehen werden. Der Fortfall aller Schwierigkeiten war zu erwarten bei Anwendung eines Lösungsmittels, in dem die Amino-säuren hinreichend löslich sind und dessen restlose Entfernung bei möglichst niedriger Temperatur durchführbar ist. E. C. Franklin und C. A. Kraus[8]) haben eine große Zahl von organischen Substanzen auf ihre Löslichkeit in flüssigem Ammoniak geprüft und dabei auch eine relativ gute Löslichkeit der Amino-säuren gefunden. Diese Beobachtung der amerikanischen Forscher konnte nun dazu benutzt werden, die gewünschten Salze der Amino-säuren rein herzustellen. Aus Lösungen in wasser-freiem Ammoniak wurden die Monocarbonsäuren unverändert zurückgewonnen, während bei den Dicarbonsäuren *d*-Glutaminsäure und *l*-Asparaginsäure die Monoammoniumsalze entstanden.

---

[8]) Amer. chem. Journ. **20**, 820 [1898].

Die Indifferenz der Amino-monocarbonsäuren gegenüber flüssigem Ammoniak als Lösungsmittel ist unabhängig von der Stellung der Aminogruppe, die α,- β- und γ-Amino-säuren verhalten sich vollkommen gleich. Eine Aussage über die Struktur der Monocarbonsäuren in gelöstem Zustande, d. h. ob die innere Salzbildung aufgehoben und eine Bindung des Carboxyls an Ammoniak erfolgt ist, erscheint auf Grund des bisherigen Materials natürlich nicht möglich. Die Form der Abscheidung aus dem Ammoniak spricht aber nicht dafür, daß in der Lösung ein Bindungswechsel und später beim Abdunsten des Ammoniaks eine Rückbildung des inneren Salzes eintritt. Die Mono-carbonsäuren werden als feinkrystallines, lockeres Pulver zurückgewonnen, ihre Abscheidung erfolgt schon beim beginnenden Abdestillieren des Ammoniaks, setzt sich gleichmäßig fort und selbst beim Entfernen des letzten Ammoniak-Restes findet keine sichtbare Veränderung mehr statt. Das äußere Bild bei der Gewinnung von Ammoniumsalzen der Dicarbonsäuren ist vollkommen abweichend. Nach dem Abdestillieren eines großen Teils vom Lösungsmittel scheidet sich an den Wänden das Ammoniumsalz als durchscheinender Sirup ab, der sich beim Entfernen der letzten Reste Ammoniak zu einem lockeren, blasigen Schaum aufbläht. Die Frage nach dem Zustand der Amino-säuren in flüssigem Ammoniak soll daher zunächst vollkommen offengelassen werden. Denn die eben erwähnten Beobachtungen sind nicht entscheidend, und die zahlreichen Beobachtungen[9]) über Unterschiede zwischen Wasser und Ammoniak als Lösungsmittel dürfen nicht übersehen werden. Es wird auch weiter empfehlenswert sein, eine zweite Frage nicht endgültig zu entscheiden. Die Konstitution der Monoammoniumsalze der Dicarbonsäuren läßt sich zunächst noch nicht eindeutig festlegen. Bei dem vollkommen gleichen Verhalten der α-, β- und γ-Amino-monocarbonsäuren gegenüber flüssigem Ammoniak ist nicht vorauszusehen, welches Carboxyl der Dicarbonsäuren mit flüssigem Ammoniak unter Bildung des Ammoniumsalzes und welches zur inneren Salzbildung verwendet wird. E. Abderhalden und K. Kautzsch[7]) haben dem aus wäßriger Lösung gewonnenen Mononatriumsalz der *d*-Glutaminsäure die Formel I zugesprochen, die erhaltene innere Salzbildung also zwischen der Aminogruppe und dem γ-ständigen Carboxyl angenommen. Bei Übertragung auf die Monoammoniumsalze würden sich die Formeln IV und V ergeben.

Die Natriumsalze der Amino-säuren lassen sich nun darstellen durch Anwendung der blauen Lösung von metallischem Natrium in Ammoniak. Die innermolekulare Salzbildung der Amino-säuren wird also durch den Natrium-Ammonium-Komplex aufgehoben und so nicht nur die Darstellung von Natriumsalzen der Monocarbonsäuren ermöglicht, sondern auch die von Dinatriumsalzen der Dicarbonsäuren. Der Endpunkt des Umsatzes zum Salz zeigt sich dabei sehr deutlich am völligen Verschwinden der blauen Farbe. Nach dem Abdestillieren des Ammoniaks bleiben die Natriumsalze vollkommen rein als feinkrystalline Pulver zurück.

Erwähnt müssen aber einige Grenzfälle werden, bei denen die Anwendung von Natrium in Ammoniak nicht zum Ziele führt: Nicht darstellbar sind so die Mononatriumsalze der Dicarbonsäuren. Beim Umsatz mit nur 1 Äquiv. Natrium verläuft die Reaktion so, daß sich außer dem Mononatrium-

---

[9]) s. die Zusammenfassung bei K. Fredenhagen, Ztschr. anorgan. Chem. **186**, 1 [1930].

salz auch das Dinatriumsalz bildet und der restliche Säure-Anteil mit Ammoniak unter Bildung des Monoammoniumsalzes reagiert. Zur Prüfung wurde *d*-Glutaminsäure verwendet und die Analyse der dabei erhaltenen Produkte spricht eindeutig für diesen Reaktionsverlauf.

Nebenreaktionen erfolgen weiter bei den Halbamiden der Dicarbonsäuren, von denen Asparagin als Beispiel benutzt wurde. Asparagin wurde aus Ammoniak allein unverändert zurückgewonnen; mit 1 Äquiv. Natrium entstanden inhomogene Produkte, ein Ergebnis, das zwanglos durch den teilweisen Eintritt des Natriums an die Stelle von Säure-amid-Wasserstoff erklärt wird.

Auch vom Cystin lassen sich keine reinen Dinatriumsalze herstellen, da durch den entwickelten Wasserstoff eine teilweise Reduktion zum Cystein erfolgt. Der Eintritt dieser Reduktion zeigt sich in den Analysenzahlen nur schwach, wird aber mit Sicherheit durch den positiven Ausfall der Reaktion mit Nitroprussidnatrium bewiesen. Diese Reduktion wird sich voraussichtlich vermeiden lassen, wenn man an Stelle von metallischem Natrium Natrium-amid verwendet.

## Beschreibung der Versuche.

Nach Fodor und Weitzmann[5]) wurden dargestellt:

1) Aus 1.7296 g *d, l*-Leucin und der berechneten Menge Natriumäthylat das Natriumsalz.

0.4353 g Sbst.: 27.55 ccm $^1/_{10}$-*n*. $H_2SO_4$ (Kjeldahl). — 0.0375 g Sbst.: 5.46 ccm N (17°, 749 mm, van Slyke[10])). — 0.5866 g Sbst.: 0.2758 g $Na_2SO_4$.

$C_6H_{12}O_2NNa$. Ber. Na 15.02, N 9.15. Gef. Na 15.22, N 8.86, $NH_2$-N 8.28.

2) Aus 5.3666 g *d, l*-Alanin und der berechneten Menge Natriumäthylat das Natriumsalz. Nach dem Abdestillieren des Alkohols wurde ein zäher, durchsichtiger Sirup erhalten, der nach längerem Stehen z. T. krystallin erstarrte.

1.0115 g Sbst.: 0.6263 g $Na_2SO_4$. — 0.5155 g Sbst.: 44.40 ccm $^1/_{10}$-*n*. $H_2SO_4$ (Kjeldahl). — 0.0422 g Sbst.: 6.5 ccm N (15°, 744 mm, van Slyke). — 0.1071 g Sbst.: 16.41 ccm N (15°, 749 mm, van Slyke).

$C_3H_6O_2NNa$. Ber. Na 20.71, N 12.61. Gef. Na 20.05, N 12.06, $NH_2$-N 8.81, 8.80.

3) Beim Umsatz von Glykokoll mit der berechneten Menge Natriumäthylat auf dem Wasserbade erfolgte abweichend von 2) und 3) keine vollständige Lösung. Nach dem Abdestillieren des Alkohols hinterblieb ein fester, z. T. gelb gefärbter Rückstand, der sehr intensiv nach Methylamin roch, so daß von einer Analyse der Substanz abgesehen wurde.

### Mononatriumsalz der *d*-Glutaminsäure.

Nach Abderhalden und K. Kautzsch[7]) wurden 4.8268 g reiner *d*-Glutaminsäure mit der berechneten Menge 5-*n*. Natriumhydroxyd-Lösung umgesetzt. Das erhaltene Salz wurde im Vakuum bei 100° über Phosphorpentoxyd getrocknet.

Zum Trocknen wurde eine Apparatur benutzt, die eine Modifikation der von Ihlow[11]) angegebenen Form darstellt. Der Trockenraum ist zum Unterschied von der allgemein üblichen Form der sogen. Trockenpistole vertikal gestellt. Diese anscheinend

---

[10]) Verwendet wurde die von H. Fuchs, Biochem. Ztschr. **176**, 32 [1926], beschriebene Mikro-Apparatur.

[11]) Chem.-Ztg. **47**, 186 [1923].

geringfügige Änderung bietet aber eine Reihe von Vorteilen: So können an Stelle von Schiffchen zur Aufnahme der Substanz Wägegläschen verwendet werden, was besonders bei größeren Mengen relativ leichter Substanzen angenehm ist. Bei notwendigen häufigen Prüfungen auf Gewichtskonstanz durch Wägung ist dadurch ein schnelleres Ein- und Ausbringen der Substanz möglich, ein Vorteil, der bei stark hygroskopischen Substanzen besonders in Erscheinung tritt. Weiter muß noch als Vorteil angeführt werden, daß Tiegel, Extraktionshülsen usw. getrocknet werden können.

Das erhaltene Natriumsalz der Glutaminsäure war nach 10-tägigem Trocknen gewichtskonstant.

0.2659 g Sbst.: 19.3 ccm N (19.5°, 753 mm). — 0.5842 g Sbst.: 0.2476 g $Na_2SO_4$.
$C_5H_8NO_4Na$. Ber. N 8.25, Na 13.60. Gef. N 8.39, Na 13.72.

Bei einer präparativen Darstellung des Salzes, ausgehend von 55.5 g *d*-Glutaminsäure war das Salz selbst nach 4-wöchigem Trocknen noch nicht vollständig gewichtskonstant.

0.4315 g Sbst.: 21.97 ccm $^1/_{10}$-*n*. $H_2SO_4$ (Kjeldahl). — 0.0754 g Sbst.: 7.99 ccm N (19.5°, 752 mm, van Slyke).

Gef. N 7.13, $NH_2$-N 5.98.

## Salze der Amino-säuren aus flüssigem Ammoniak.

Verwendet wurde das käufl. Ammoniak. Das der Stahlflasche entnommene Gas wurde durch eine ca. 1 m lange Schicht von Natronkalk und stückigem Natriumhydroxyd getrocknet und zur Entfernung der letzten Spuren Feuchtigkeit in einem Vorratsgefäß über metallischem Natrium kondensiert (Aceton-Kohlensäure-Schnee zur Kühlung). Als Reaktionsgefäß wurden einseitig zugeschmolzene Röhren aus Jenaer Glas von ca. 20 cm Länge benutzt, in die das Ammoniak aus dem Vorratsgefäß überdestilliert wurde.

I. Die Indifferenz der Monocarbonsäuren gegenüber flüssigem Ammoniak wurde bei den im folgenden angegebenen Säuren festgestellt. Nach dem Abdunsten des Ammoniaks wurden die Säuren als feinkrystallines Pulver zurückgewonnen; an der Glaswand abgesetzte Schichten waren leicht abzulösen. Die beigefügten Zahlen beziehen sich in der angegebenen Reihenfolge auf den gefundenen Stickstoffwert nach Kjeldahl vor und nach dem Lösen in Ammoniak, der theoretische Wert ist in Klammern gesetzt: Glykokoll: 18.69, 18.48 (18.66); *d, l*-Alanin: 15.85, 15.85 (15.73). β-Alanin: 15.45, 16.11 (15.73); γ-Amino-buttersäure: 13.38, 13.56 (13.59). Nach dem Abdestillieren des Ammoniaks wurden die Reaktionsgefäße mit Inhalt sofort in einen großen Vakuum-Exsiccator mit Schwefelsäure und Natriumhydroxyd übergeführt und die letzten Reste Ammoniak durch mehrstündiges Abpumpen entfernt. Ein Ausbringen des festen Rückstandes vor der völligen Entfernung des Ammoniaks ist ausgeschlossen, da die Produkte in diesem Zustande sehr hygroskopisch sind. Die größere Beständigkeit der ammoniakfreien Substanzen gegen die Luft-Feuchtigkeit wurde auch bei den weiter unten beschriebenen Ammonium- und Natriumsalzen gefunden.

II. Die Monoammoniumsalze der Dicarbonsäuren wurden durch Behandeln der Säuren mit flüssigem Ammoniak erhalten. Der Unterschied gegenüber den Monocarbonsäuren zeigte sich schon darin, daß bei ungefähr den gleichen angewandten Mengen in dem gleichen Volumen Ammoniak keine vollständige Lösung erfolgte und das gebildete Ammoniumsalz nach dem Abdunsten des Ammoniaks als rein weißer, voluminöser Schaum zurückblieb.

Ammoniumsalz der *l*-Asparaginsäure: 0.00921 g Sbst.: 6.130 ccm $^1/_{50}$-*n*. $H_2SO_4$ (alkalische Destillation) (Kjeldahl). — 0.00921 g Sbst.: 3.085 ccm $^1/_{50}$-*n*. $H_2SO_4$.

$C_4H_{10}O_4N_2$. Ber. N 18.67, $NH_4$ 12.02. Gef. N 18.65, $NH_4$ 12.09.

Ammoniumsalz der *d*-Glutaminsäure: 0.4798 g Sbst.: 58.11 ccm $^1/_{10}$-*n*. $H_2SO_4$ (Kjeldahl). — 0.3254 g Sbst.: 19.93 ccm $^1/_{10}$-*n*. $H_2SO_4$ (alkalische Destillation).

$C_5H_{12}O_4N_2$. Ber. N 17.07, $NH_4$ 10.99. Gef. N 16.97, $NH_4$ 11.05.

III. Natriumsalze der Amino-säuren: Das metallische Natrium und die Amino-säuren wurden genau in dem jeweiligen Mengenverhältnis in die Reaktionsgefäße eingewogen. Zur möglichsten Vereinfachung wurde dabei zunächst das metallische Natrium eingewogen. Zweckmäßig hat sich dabei die Verwendung von ca. 3 mm starkem Draht erwiesen, wobei die Drahtlänge in cm schon eine angenäherte Festlegung der Metallmenge gestattete. Die Einwage der Amino-säuren wurde dann auf das genau ermittelte Natriumgewicht bezogen. Aus dem Vorratsgefäß wurde bis zur Lösung und Entfärbung der anfangs blauen Lösung Ammoniak in das Reaktionsgefäß destilliert. Die für jeden Umsatz verwendete Menge Ammoniak ist als geschätztes Volumen jeweils angegeben.

1) Aus 2.3660 g Glykokoll und 0.7250 g Natrium in ca. 30 ccm Ammoniak das Natriumsalz: 0.00725 g Sbst.: 3.793 ccm $^1/_{50}$-*n*. $H_2SO_4$ (Kjeldahl). — 0.4873 g Sbst.: 0.3569 g $Na_2SO_4$.

$C_2H_4O_2NNa$. Ber. N 14.44, Na 23.70. Gef. N 14.64, Na 23.72.

2) Aus 2.0720 g *d, l*-Alanin und 0.5350 g Natrium in 30 ccm Ammoniak: 0.02379 g Sbst.: 10.73 ccm $^1/_{50}$-*n*. $H_2SO_4$ (Kjeldahl). — 0.6940 g Sbst.: 0.4495 g $Na_2SO_4$.

$C_3H_6O_2NNa$. Ber. N 12.61, Na 20.71. Gef. N 12.64, Na 20.97.

3) Aus 2.5689 g *d, l*-Leucin und 0.4509 g Natrium in 50 ccm Ammoniak. — 0.00907 g Sbst.: 3.015 ccm $^1/_{50}$-*n*. $H_2SO_4$ (Kjeldahl). — 0.5671 g Sbst.: 0.2656 g $Na_2SO_4$. — 0.0450 g Sbst.: 7.01 ccm N (15°, 749 mm, van Slyke).

$C_6H_{12}O_2NNa$. Ber. N 9.15, Na 15.02, $NH_2$-N 9.15. Gef. N 9.31, Na 15.16, $NH_2$-N 8.94.

4) Aus 2.0635 g *d, l*-Phenyl-alanin und 0.2874 g Natrium in 30 ccm Ammoniak. 0.01525 g Sbst.: 4.135 ccm $^1/_{50}$-*n*. $H_2SO_4$ (Kjeldahl). — 0.3003 g Sbst.: 0.1170 g $Na_2SO_4$:

$C_9H_{10}O_2NNa$. Ber. N 7.49, Na 12.29. Gef. N 7.60, Na 12.62.

5) Aus 1.9430 g Sarkosin und 0.5018 g Natrium in ca. 50 ccm Ammoniak: 0.02804 g Sbst.: 12.620 ccm $^1/_{50}$-*n*. $H_2SO_4$ (Kjeldahl). — 0.4188 g Sbst.: 0.2688 g $Na_2SO_4$.

$C_3H_6O_2NNa$. Ber. N 12.62, Na 20.71. Gef. N 12.61, Na 20.78.

6) Aus 1.944 g *l*-Tyrosin und 0.3033 g Natrium in 50 ccm Ammoniak das Dinatriumsalz: 0.02548 g Sbst.: 5.883 ccm $^1/_{50}$-*n*. $H_2SO_4$ (Kjeldahl). — 0.5129 g Sbst.: 0.3248 g $Na_2SO_4$.

$C_9H_9O_3NNa_2$. Ber. N 6.22, Na 20.43. Gef. N 6.47, Na 20.51.

7) Aus 1.5916 g β-Alanin und 0.4110 g Natrium in ca. 60 ccm Ammoniak das Natriumsalz: 0.1864 g Sbst.: 16.28 ccm $^1/_{10}$-*n*. $H_2SO_4$ (Kjeldahl). — 0.3422 g Sbst.: 0.2231 g $Na_2SO_4$.

$C_3H_6O_2NNa$. Ber. N 12.61, Na 20.71. Gef. N 12.24, Na 21.11.

Die Differenz zwischen gefundenen und berechneten Werten ist auf die Verwendung von nicht vollkommen reiner Säure zurückzuführen.

8) Aus 1.9075 g γ-Amino-*n*-buttersäure und 0.4266 g Natrium in 30 ccm Ammoniak: 0.3961 g Sbst.: 31.10 ccm $^1/_{10}$-*n*. $H_2SO_4$ (Kjeldahl). — 0.6575 g Sbst.: 0.3728 g $Na_2SO_4$.

$C_4H_8O_2NNa$. Ber. N 11.20, Na 18.39. G f. N 11.00, Na 18.36.

9) Aus 2.3382 g *d*-Glutaminsäure und 0.7311 g Natrium in 120 ccm Ammoniak das Dinatriumsalz: 0.02778 g Sbst.: 7.220 ccm $^1/_{50}$-*n*. $H_2SO_4$. — 0.7662 g Sbst.: 0.5633 g $Na_2SO_4$.

$C_5H_7O_4NNa_2$. Ber. N 7.33, Na 24.07. Gef. N 7.28, Na 23.81.

# Über den $\gamma$-Glutaminyl-glycin-ester

Die Chemie der Glutaminsäure-peptide ist trotz der weiten Verbreitung der Säure noch wenig ausgebaut. Vor allem beanspruchen diejenigen Peptide, bei denen die Peptidbindung durch ein Carboxyl der Glutaminsäure geknüpft wird, ein besonderes Interesse, seitdem im Glutathion[1]) ein derartiger Fall aufgefunden worden ist. Beschränkt man sich bei synthetischen Versuchen fürs erste auf die klassischen Methoden, und geht dabei von der d-Glutaminsäure als Ausgangsmaterial aus, so ergeben sich Schwierigkeiten durch das Vorhandensein von zwei Carboxylgruppen. Es erscheint also als erste Aufgabe, nur ein bestimmtes der beiden Carboxyle in Reaktion zu bringen.

In einer früheren Mitteilung[2]) ist gezeigt worden, daß eine von C. P. Stewart und H. E. Tunnicliffe[3]) entwickelte Synthese von $\gamma$-Glutaminyl-peptiden (I) nicht brauchbar ist. Die Glutaminsäure selbst reagiert unter schonenden Bedingungen nicht mit Phosphorpentachlorid; ein Monochlorid der Säure ist aber darstellbar durch Einwirkung von Thionylchlorid auf das wasserfreie Mono-ammonsalz, über dessen Darstellung vor einiger Zeit berichtet

[1]) E. Kendall, H. L. Mason u. B. F. Mc Kenzie, J. of biol. Chem. **84**, 657 (1929); **87**, 55 (1930); **88**, 409 (1930); **90**, 25 (1931); B. H. Nicolet, J. of biol. Chem. **88**, 389 (1930).

[2]) Biochemic. J. **19**, 207 (1925).

[3]) II. Mitteilung: Ber. chem. Ges. **63**, 1726 (1930).

wurde. Das erhaltene Produkt, theoretisch ein Gemisch von 1 Mol. Ammonchlorid mit 1 Mol. des Monochlorids der d-Glutaminsäure (III), ist aber nicht einheitlich, sondern enthält noch etwa 25% l-Pyrrolidonylchlorid; denn bei dem Umsatz mit Anilin erhält man neben dem Monoanilid der d-Glutaminsäure (I, R = $C_6H_5$) noch das Anilid dieser Säure. Die Bildung des Pyrrolidonylanilids kann aber nur auf einen Gehalt an Pyrrolidonyl-chlorid zurückgeführt werden; eine etwaige Entstehung nach W. Gray[1]) aus freier Glutaminsäure oder freier Pyrrolidoncarbonsäure ist nach Kontrollversuchen unter den angewandten Reaktionsbedingungen nicht möglich. Die Bildung von l-Pyrrolidonyl-chlorid (IV) aus diesem Chlorid der d-Glutaminsäure ergibt sich leicht durch eine zur l-Pyrrolidoncarbonsäure führende Abspaltung von Chlorwasserstoff und darauffolgende weitere Einwirkung von Thionylchlorid.

Die prinzipielle Verwendbarkeit des erhaltenen Glutaminylchlorids zur Synthese von γ-Glutaminyl-peptiden[2]) hängt von der Konstitution des erhaltenen Glutaminyl-mono-anilids ab, die daher mit besonderer Sorgfalt durch oxydativen Abbau nach H. D. Dakin[3]) und auch nach St. Goldschmidt[4]) festgelegt worden ist.

Der Abbau mit Wasserstoffsuperoxyd läßt beim γ-Anilid (I, R = $C_6H_5$) Succinanilsäure (XI) erwarten, das ebenfalls in Betracht zu ziehende α-Anilid (II, R = $C_6H_5$) würde Bernsteinsäure ergeben; erhalten wurde aber das Succinanil (VII). Ein Übergang von etwa primär gebildeter Succinanilsäure in das Anil unter den Versuchsbedingungen ist ausgeschlossen; dahingehende Versuche verliefen negativ. Es kann also nur ein im Laufe der Oxydation auftretendes reaktionsfähiges Zwischenprodukt (Anilid des Halbaldehyds der Bernsteinsäure, V) den Fünfring geschlossen haben, und dann weiter oxydiert worden sein.[5])

---

[1]) J. chem. Soc. London **1928**, S. 1264.

[2]) B. N. Nicolet, J. Amer. chem. Soc. **52**, 1192 (1930), hat in Anlehnung an Arbeiten von M. Bergmann einen anderen Weg unter Verwendung von acetylierten Anhydriden der Glutaminsäure versucht.

[3]) J. of biol. Chem. **4**, 63 (1908).

[4]) Liebigs Ann. **456**, 1 (1927).

[5]) Stewart u. Tunnicliffe haben unter dürftiger Angabe der experimentellen Daten ein vermeintliches γ-Mono-anilid der d-Glutaminsäure erwähnt und angegeben, daß der Abbau mit Wasserstoffsuperoxyd in vollkommen normalerweise zur Succinanilsäure geführt habe.

I. $HO_2C \cdot CH(NH_2) \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CO \cdot NH \cdot R$ II. $HO_2C \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH \cdot (NH_2) \cdot CO \cdot NH \cdot R$

III. $HO_2C \cdot CH(NH_2) \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CO \cdot Cl$ IV. $Cl \cdot OC \cdot CH \cdot CH_2 \cdot CH_2$ (NH——CO)

V. $OHC \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CO \cdot NH \cdot C_6H_5$ VIII. $BrN{:}CH \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CO \cdot NH \cdot C_6H_5$

VI. $CH_2 \cdot CH_2 \cdot CO$ / $H \cdot C$——$N \cdot C_6H_5$ / $HO$ IX. $N{:}C \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CO \cdot NH \cdot C_6H_5$

VII. $CH_2 \cdot CH_2 \cdot CO$ / $OC$——$N \cdot C_6H_5$ ← X. $CH_2 \cdot CH_2 \cdot CO$ / $HN{:}C$——$N \cdot C_6H_5$

XI. $HO_2C \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CO \cdot NH \cdot C_6H_5$ XII. $HO_2C \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot C{:}N$

Der Abbau nach St. Goldschmidt mit alkalischem Hypobromit sollte bei einem $\gamma$-Anilid das Nitril der Succinanilsäure (IX) und bei einem $\alpha$-Anilid das Halbnitril der Bernsteinsäure (XII) liefern. Erhalten wurde wieder Succinanil, das aber nicht Primärprodukt des Abbaues war. Isoliert wurde zunächst ein Körper mit völlig anderen Eigenschaften. Erst beim Umkrystallisieren aus verdünntem Alkohol erfolgte unter den im Versuchsteil angegebenen Erscheinungen seine Umwandlung in das Anil. Über seine Natur kann noch nichts Sicheres ausgesagt werden. Der relativ hohe, mit Silbernitrat nachweisbare Bromgehalt und das Ausbleiben einer Ammoniakentwicklung (X ⟶ VII) bei der Umwandlung (VIII ⟶ IX ⟶ X ⟶ VII) machen das Vorliegen des Anilids der Brom-imino-buttersäure (VIII) sehr wahrscheinlich.

Beide Abbaumethoden ergeben somit zweifellos die $\gamma$-Struktur des Anilids (I), und damit auch die des Säurechlorids (III), das als Hauptbestandteil bei der Chlorierung des glutaminsauren Ammoniums[1]) entsteht.

[1]) Die Konstitution des wasserfreien Ammonsalzes der d-Glutaminsäure war in der 2. Mitteilung [Ber. chem. Ges. **63**, 1728 (1930)] offen geblieben. Herr Prof. F. Arndt, Breslau, wies in einer Diskussion darauf hin, daß die Zuteilung des Kations $NH_4^+$ zu einem bestimmten Carboxyl willkürlich und nicht berechtigt sei, da in Lösung doch das Zwitterion $^-O_2C \cdot CH(NH_3)^+ \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CO^-$ anzunehmen ist. Unter Verzicht auf eine formelmäßige Darstellung des Ammonsalzes müssen wir auf Grund der oben angeführten Umsetzungen doch annehmen, daß im festen Salz die Beziehungen des Kations zum $\gamma$-ständigen Carboxyl enger sind als zum $\alpha$-ständigen. Gesicherte Vorstellungen über die Struktur des festen Ammonsalzes lassen sich auch unter Berücksichtigung der kürzlich von J. D. Bernal, Z. f. Krist. **78**, 363 (1931), begonnenen röntgenographischen Untersuchung der Aminosäuren noch nicht entwickeln.

Die Kupplung des $\gamma$-Glutaminylchlorids mit Aminosäuren ist zunächst nur mit Glycin durchgeführt worden. Das Chlorid läßt sich in Chloroform mit überschüssigem Glycin-äthyl-ester umsetzen; das Rohprodukt mußte natürlich neben dem $\gamma$-Glutaminyl-glycin-ester (I, R = $CH_2 \cdot CO_2C_2H_5$) noch l-Pyrrolidonyl-glycin-ester, Glycin-ester-chlorhydrat und Ammon-chlorid enthalten. Zur Abtrennung des Pyrrolidonyl-glycinesters diente seine Löslichkeit in heißem Aceton; die Abtrennung der anderen Beimengungen gelang bis auf einen Restgehalt von etwa 4,5% Ammonchlorid. Die Analysenzahlen und das Mengenverhältnis der nach der Hydrolyse isolierten Spaltstücke zeigen aber, daß in dem erhaltenen zähen Sirup[1]) der d-Glutaminyl-glycin-äthyl-ester vorlag.

Versuche, nach E. Fischer den nichtkrystallisierenden Ester in das vermutlich krystalline Glutaminyl-glycin durch kurze Behandlung mit wäßrigem Alkali zu überführen, schlugen fehl. Neben der Verseifung des Carbäthoxyls erfolgte Lösung der Peptidbindung. Auch durch Anwendung von alkoholischem Kaliumhydroxyd war kein Fortschritt zu erzielen. Als zweites Spaltstück entstand neben dem Glycin aber nicht die erwartete Glutaminsäure, sondern Pyrrolidon-carbonsäure. Gegen Säuren ist der Peptidester ebenfalls äußerst unbeständig, so daß z. B. ein Hydrochlorid nicht dargestellt werden konnte. Nach Zugabe der berechneten Menge Chlorwasserstoff in absolut alkoholischer Lösung, Bedingungen, die sich bei der Darstellung des Hydrochlorids vom Glutaminyl-anilid durchaus bewährt hatten, erfolgte eine momentane Spaltung unter Bildung von Glycin-ester-chlorhydrat und wiederum l-Pyrrolidon-carbonsäure. Das unterschiedliche Verhalten der Peptidbindung im Glutaminyl-anilid und Glutaminyl-glycin-ester gegen alkoholische Salzsäure kann nicht durch eine allgemeine geringere Haftfestigkeit des Glycinrestes erklärt werden, denn Glycyl-glycin ist z. B. gegen alkoholische Salzsäure durchaus beständig, und liefert bei Erwärmen das Chlorhydrat des Glycyl-glycinesters.[2])

Die festgestellte leichte Spaltung des Glutaminyl-glycin-esters entspricht nun weitgehend der auffallend leicht erfolgenden Hydrolyse des Glutathions, die von H. L. Mason[3]) eingehend untersucht wurde, und bei der ebenfalls an Stelle der zu erwartenden d-Glut-

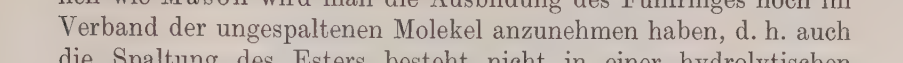
---

[1]) Vgl. die entsprechende Beobachtung von E. Fischer, Ber. chem. Ges. **38**, 2914 (1905), bei anderen Peptidestern.

[2]) E. Fischer u. F. Fourneau, Ber. chem. Ges. **34**, 2868 (1901).

[3]) J. of biol. Chem. **90**, 25 (1931).

aminsäure die l-Pyrrolidon-carbonsäure gefunden worden ist. Berücksichtigt man die Verwendung von absolutem Alkohol als Lösungsmittel bei der Spaltung des Glutaminyl-glycin-esters, so wird eine reine Hydrolyse der Peptidbindung ausgeschlossen. Ähnlich wie Mason wird man die Ausbildung des Fünfringes noch im Verband der ungespaltenen Molekel anzunehmen haben, d. h. auch die Spaltung des Esters besteht nicht in einer hydrolytischen Sprengung der Peptidbindung, sondern in einem intramolekularen Zerfall der Molekel unter direkter Bildung der Pyrrolidon-carbonsäure.



Diese Vorstellung läßt aber bei allen $\gamma$-Glutaminylpeptiden mit endständigem Glutaminylrest eine weitgehende Unbeständigkeit erwarten; die experimentelle Prüfung hätte zunächst an sinngemäß substituierten Derivaten einzusetzen.

Im Hinblick auf die unerwartete Bildung von Pyrrolidoncarbonsäure bei der Einwirkung von Säure und Alkali in Alkohol auf den Glutaminyl-glycin-ester interessiert natürlich die Einwirkung dieser Agenzien auf den Pyrrolidonyl-glycin-ester. Der nach E. Abderhalden[1]) dargestellte Ester war aber gegen alkoholische Salzsäure vollkommen beständig; mit alkoholischem Kaliumhydroxyd erfolgte im wesentlichen nur eine Verseifung zum Pyrrolidonyl-glycin.[2])

Auch mit Phenyl-isocyanat oder α-Naphthyl-isocyanat ließen sich krystalline Derivate des Glutaminyl-glycin-esters nicht gewinnen. Ein Umsatz sollte direkt mit überschüssigem Isocyanat erfolgen, da die übliche Ausführung in wäßrig-alkalischer Lösung[3]) auszuscheiden war. Bei der Prüfung der als Modellsubstanzen verwendeten Anilide der Glutamin- und Pyrrolidon-carbonsäure zeigte es sich, daß trotz der freien Aminogruppe das Glutaminyl-anilid nicht reagierte, sondern nur das Pyrrolidonyl-anilid. Es wird anzunehmen sein, daß die Reaktion am Stickstoff des Pyrrolringes eingesetzt hat, da T. B. Johnson und H. H. Guest[4]) auch ein Thiohydantoin der Pyrrolidoncarbonsäure darstellen konnten.

---

[1]) Ber. chem. Ges. **43**, 2152 (1910).

[2]) Diese Versuche stehen auch in einem gewissen Zusammenhang mit dem noch nicht befriedigend gelösten Problem einer Synthese von α-Glutaminyl-peptiden (II) [vgl. dazu E. Abderhalden, Z. physiol. Chem. **107**, 1 (1919); Fermentforsch. **9**, 501 (1928)].

[3]) C. Neuberg u. Manasse, Ber. chem. Ges. **38**, 2359 (1905).

[4]) Amer. chem. J. **48**, 103 (1912).

Die zur Durchführung der Untersuchung gebrauchten größeren Mengen Glutaminsäure wurden von der Chemischen Fabrik Promonta, Hamburg, der ich dafür zu großem Dank verpflichtet bin, zur Verfügung gestellt.

## Beschreibung der Versuche.

### Einwirkung von Thionylchlorid auf das Mono-ammonsalz der d-Glutaminsäure.

Das Ammonsalz wurde in der 10fachen Menge Äther aufgeschlämmt und mit 1 Mol. Thionylchlorid[1]) in einer geeigneten Kugelmühle unter Feuchtigkeitsausschluß und bei möglichst niedriger Zimmertemperatur 48 Stunden gemahlen. Das nach dem Abfiltrieren erhaltene Produkt war ein ockerfarbenes, hygroskopisches Pulver.

0,2031 g Substanz gaben 16,82 ccm n/10-$AgNO_3$.

Gef. Cl 29,36%
Ber. „ 32,38% für ein Gemisch von 1 Mol Ammonchlorid und 1 Mol Glutaminyl-monochlorid.

### Umsatz von Glutaminyl-chlorid mit Anilin.

18,5 g Chlorid wurden in kleinen Portionen in eine Lösung von 18 g Anilin in 150 ccm trockenem Chloroform bei starker Kühlung und unter ständigem mechanischem Rühren eingetragen. Nach 30stündigem Stehen bei Zimmertemperatur stellte das Reaktionsgemisch eine feine, hellgraue Emulsion dar, die weder durch Filtrieren, noch durch Zentrifugieren geklärt werden konnte. Vom gesamten Reaktionsgemisch wurde daher das Chloroform im Vakuum bei 30° völlig abgepumpt, der zurückgebliebene zähe Sirup mit absolutem Äther durchgerieben und ausgekocht.

1. Isolierung von l-Pyrrolidonyl-anilid: Die durch die Ätherbehandlung festgewordene Substanz wurde fein gepulvert und im Soxhlet mit dem zum Auskochen benutzten Äther erschöpfend extrahiert. Nach dem Abdestillieren des Äthers hinterblieb ein sirupöser, zum Teil krystalliner Rückstand. Nach zweimaligem Umkrystallisieren aus Wasser: derbe, farblose Nadeln. Schmelzp. 185—187°.

[1]) Nach Meyer u. Schlegel, Mh. Chem. 34, 569 (1913), über Leinöl destilliert.

0,1130 g Substanz gaben 0,2682 g $CO_2$, 0,0601 g $H_2O$.
0,1834 g „ „ 17,7 ccm n/10-$H_2SO_4$ (Kjeldahl).
0,3426 g „ „ in 25,59 g Eisessig: $\Delta = 0{,}246$.

$C_{11}H_{12}O_2N_2$ Ber. C 64,68% H 5,93% N 13,72%. Mol.-Gew. 204,18.
Gef. „ 64,73 „ 5,95 „ 13,52 Mol.-Gew. 212,2.

$[\alpha]_D^{22} = +0{,}14 \times 42{,}6753 / 2 \times 0{,}1998 \times 0{,}8580 = +17{,}43^0$ [1]) in 80%igem Alkohol.

2. Isolierung von d-Glutaminyl-anilid. Der von l-Pyrrolidonyl-anilid befreite Rückstand wurde mit 150 ccm absolutem Alkohol ausgekocht und die Lösung nach dem Erkalten filtriert.

a) Das Ungelöste (5,7 g) lieferte nach dem Umkrystallisieren aus Wasser unter Zusatz von A-Kohle 1,7 g d-Glutaminyl-anilid in sehr feinen, weißen Nädelchen, die sich bei 194,5° ohne vorhergehendes Sintern zersetzten. Durch Einengen der Mutterlauge noch 0,4 g Anilid, als Rückstand nach dem Eindampfen 3,4 g Ammonchlorid. Nach einmaligem Umkrystallisieren des Anilids aus Wasser: ab 206° schwaches Sintern, 209° Schmelzen unter Zersetzung. Löslich in Alkohol, Eisessig und heißem Wasser, unlöslich in Äther und Benzol.

0,1155 g Substanz gaben 0,2517 g $CO_2$, 0,0634 g $H_2O$.
0,2075 g „ „ 18,72 ccm n/10-$H_2SO_4$ (Kjeldahl).
0,01157 g „ „ 1,35 ccm N (22°, 745 mm, van Slyke).

$C_{11}H_{14}O_3N_2$ Ber. C 59,44% H 6,35% N 12,61% $NH_2N$ 6,30%
Gef. „ 59,43 „ 6,14 „ 12,64 „ 6,44

b) Die alkoholische Lösung wurde auf 50 ccm eingeengt und ausgeschiedenes Ammonchlorid (1,0 g) abfiltriert. Nach Zugabe von 10 ccm Anilin schieden sich 3,7 g Glutaminyl-anilid aus. Mischprobe mit anfangs isoliertem Anilid: 205.5°. Ausbeute insgesamt: 5,8 g d-Glutaminyl-anilid und 1,7 g l-Pyrrolidonyl-anilid.

c) Chlorhydrat: Das Anilid wurde in der berechneten Menge alkoholischer Salzsäure gelöst und die Lösung bis zur beginnenden Trübung mit Äther versetzt. Feine Nadeln, die nach dem Trocknen im Vakuum bei 56° zwischen 176 und 177° schmolzen.

46,82 mg Substanz gaben 4,36 ccm N (24°, 759 mm).
36,15 mg „ „ 20,40 mg AgCl.

$C_{11}H_{15}O_3N_2Cl$ Ber. N 10,83% Cl 13,71%
Gef. „ 10,69 „ 13,96

$[\alpha]_D^{22} = +0{,}60 \times 20{,}9259 / 2 \times 0{,}2541 \times 0{,}9480 = +26{,}06^0$ in 50%igem Alkohol.

Leicht löslich in Wasser und wäßrigem Alkohol, weniger leicht in absolutem Alkohol. Aus der alkoholischen Lösung seines Chlorhydrats ließ sich das Anilid nach H. C. Benedict[2]) durch Zugabe der berechneten Menge Anilin mit 90% Ausbeute abscheiden.

---

[1]) Nach Gray, J. chem. Soc. London 1928, 1264 $[\alpha]_D^{20} = +17{,}9^0$.
[2]) J. Am. chem. Soc. 51, 2277 (1929).

**Oxydativer Abbau des Glutaminyl-anilids.**

1. Nach Dakin[1]) mit Wasserstoffsuperoxyd: In eine schwach ammoniakalische Lösung von 3 g Anilid in 500 ccm Wasser wurden nach Zugabe einiger Tropfen Ferrosulfatlösung unter Erwärmen auf dem Wasserbad 65 ccm 2,5%iges Wasserstoffsuperoxyd langsam zugetropft. Nach dem Ansäuern mit Salzsäure wurde die Lösung im Extraktionsapparat nach Steudel 48 Stunden mit Äther extrahiert. Der dunkle, ölige Ätherrückstand, aus Wasser umkrystallisiert, lieferte 0,4 g lange, leicht braungefärbte Nadeln. Nach zweimaligem Umkrystallisieren aus Wasser unter Zusatz von A-Kohle rein weiß: Schmelzp. 153—154°.

Mischprobe mit Succinanil: 152—153° [2]); Mischprobe mit Bernsteinsäure-monoanilid: 121—128°.

34,01 mg Substanz gaben 85,33 mg $CO_2$, 16,4 mg $H_2O$.
3,160 mg „ „ 0,214 ccm N (19°, 760 mm).

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| $C_{10}H_9O_2N$ | Ber. | C 68,56% | H 5,18% | N 8,00% |
| | Gef. | „ 68,42 | „ 5,40 | „ 7,92 |

Aus der wäßrigen Oxydationslösung wurden 0,55 g unverändertes Glutaminyl-anilid zurückgewonnen.

2. Nach St. Goldschmidt: In eine eisgekühlte Lösung von 16,8 g Kaliumhydroxyd und 6,0 g Brom in 300 ccm Wasser wurden 2,0 g feingepulvertes Glutaminyl-anilid im Laufe von 10 Minuten unter kräftigem Schütteln eingetragen. Die ersten Anteile lösten sich rasch, nach kurzer Zeit schieden sich rein weiße, feine Nadeln ab, die von dem jeweilig frisch hinzugegebenen feinpulvrigen Anilid deutlich unterschieden werden konnten. Nach beendetem Eintragen wurde rasch abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen über Schwefelsäure: 1,3 g leicht gelbliche Substanz, die sich im Schmelzröhrchen bei 95° unter Verpuffen und starker Dunkelfärbung zersetzte, frei von Amino-stickstoff, aber starke Halogenreaktion mit Silbernitrat. Als die Substanz mit 80 ccm 50%igem Alkohol auf dem Wasserbade unter Zusatz von wenig A-Kohle kurz erwärmt wurde, entstand eine farblose Lösung, aus der sich schon nach kurzem Abkühlen feine, farblose Nadeln ausschieden. Nach etwa 10 Minuten, während denen die Lösung ungestört bei Zimmertemperatur gestanden hatte, erfolgte spontan erneute Lösung unter gleichzeitiger starker Gelbfärbung der klaren Flüssigkeit. Die Lösung reagierte schwach sauer gegen Lackmus

[1]) J. of biol. Chem. 4, 63 (1908).
[2]) Vgl. K. v. Auwers, Liebigs Ann. 309, 326 (1899).

und roch stechend. Nach 12stündigem Stehen wurde sie wieder farblos, und es setzte erneut die Krystallisation feiner, farbloser Nadeln ein. Durch Konzentration der Lösung im Vakuum wurde die Abscheidung vervollständigt: 1. Fraktion: 0,5 g, Schmelzp. 150 bis 152°. 2. Fraktion: 0,3 g, Schmelzp. 132—141°. Beide Fraktionen enthielten geringe Mengen Brom, das sie auch nach dreimaligem Umkrystallisieren aus 50%igem Alkohol nicht verloren; mit Silbernitrat war das Brom nicht nachweisbar.[1]) Schmelzp. 154 bis 155°. Mischprobe mit Succin-anil: 152,5—154,5°.

5,002 mg Substanz gaben 12,525 mg $CO_2$, 2,325 mg $H_2O$.
3,478 mg „ „ 0,245 ccm N (20,5°, 741 mm).
5,490 mg „ „ 0,117 mg AgBr.

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| $C_{10}H_9O_2N$ | Ber. | C 68,56% | H 5,18% | N 8,00% | |
| | Gef. | „ 68,29 | „ 5,20 | „ 7,99 | Br 0,91% |

**Umsatz von Glutaminyl-chlorid mit Glycin-äthyl-ester.**

34 g Chlorid wurden in der beim Umsatz mit Anilin beschriebenen Weise mit 30 g Glycin-äthyl-ester[2]) in 300 ccm Chloroform in Reaktion gebracht. Von der entstandenen hellgrauen Emulsion wurde nach 18stündigem Stehen bei Zimmertemperatur das Chloroform im Vakuum bei maximal 30° abdestilliert und der Rückstand in 500 ccm absolutem Alkohol aufgeschlämmt. Nach mehrstündigem Stehen hatte sich ein dichter, weißer Niederschlag von Ammonchlorid mit geringen Mengen Glycin-ester-chlorhydrat abgesetzt, der durch Zentrifugieren abgetrennt und mit absolutem Alkohol ausgewaschen wurde. Die alkoholische Lösung lieferte nach dem Einengen auf 350 ccm und Zugabe des gleichen Volumens von trockenem Äther 17,0 g reines Glycin-ester-chlorhydrat. Aus Alkohol: Schmelzp. 144—147°. Auf Zusatz weiterer Mengen Äther schied sich neben dem Chlorhydrat des Glycin-esters ein hellgelbes Öl ab, dessen Fällung aber durch folgendes Verfahren vermieden werden konnte: Der Äther wurde im Vakuum abgepumpt, die restliche alkoholische Lösung konzentriert und erneut Äther bis zur beginnenden Trübung zugesetzt. Durch mehrfaches Wiederholen der gleichen Operationen wurden noch 2,8 g Glycin-ester-chlorhydrat entfernt. Nach dem Konzentrieren der alkoholischen Lösung bis auf 40 ccm wurden 300 ccm Äther dazugegeben und

[1]) Der Bromgehalt ist wahrscheinlich auf die Entstehung des p-bromierten Anils (etwa 3%) zurückzuführen; vgl. dazu Hoogewerff u. van Dorp, Rec. Trav. chim. Pays-Bas **9**, 48 (1890).

[2]) Dargestellt nach E. Fischer, Ber. chem. Ges. **34**, 433 (1901).

nach der erfolgten Klärung das ausgefällte Öl abgetrennt. Das Öl wurde im Vakuum bei 30° zur Gewichtskonstanz gebracht. Der zähe, gelbe Sirup (27,4 g) wurde zur Entfernung des l-Pyrrolidonyl-glycin-esters mit 300 ccm Aceton ausgekocht, wobei 38% der Substanz in Lösung gingen. Der Rückstand löste sich bei kurzem Erwärmen auf dem Wasserbad nicht mehr vollständig in 75 ccm absolutem Alkohol. Es blieben 0,7 g d-Glutaminsäure in Form weißer, feiner Krystalle zurück, die als Chlorhydrat durch Schmelzpunkt und Analyse identifiziert wurden. Vom alkoholischen Filtrat wurde der Alkohol im Vakuum bei 30° maximal abdestilliert, nachdem vorher zur leichteren Entfernung des Alkohols die 10fache Menge Äther hinzugegeben war. Der im Vakuum der Quecksilberpumpe bis zur Gewichtskonstanz getrocknete klare, gelbe, zähe Sirup (13,9 g) lieferte folgende Analysenzahlen:

40,01 mg Substanz gaben 65,34 mg $CO_2$, 2,51 mg $H_2O$.
37,95 mg „ „ 4,15 ccm N (21°, 747 mm).
27,80 mg „ „ 3,58 ccm N (22°, 742 mm, van Slyke)[1]).
74,4 mg „ „ 6,22 ccm n/100-$AgNO_3$.

$C_9H_{16}O_5N_2$ Ber. C 46,52% H 6,95% N 12,07% $NH_2$-N 6,03%
[95,53% $C_9H_{16}O_5N_2$ + 4,47% $NH_4 \cdot Cl$]

Ber. C 44,44% H 6,98% N 12,70% $NH_2$-N 6,93 Cl 2,96%
Gef. „ 44,64 „ 7,02 „ 12,48 „ 7,08 „ 2,96

Bei der Berechnung des Gemisches von 95,53% Glutaminyl-glycinester und 4,47% Ammonchlorid[1]) ist von den gefundenen 2,96% Chlor ausgegangen worden.

### Spaltung des γ-Glutaminyl-glycin-äthylesters.

1. Mit alkoholischem Kaliumhydroxyd: Eine Lösung von 2,45 g des analysierten Sirups in 30 ccm absolutem Alkohol wurde mit einer Lösung von 1,18 g Kaliumhydroxyd[2]) in 25 ccm absolutem Alkohol versetzt.[3]) Nach 1stündigem Stehen bei Zimmertemperatur wurde eine dem Alkali äquivalente Menge alkoholischer Salz-

[1]) Im Hinblick auf die leichte Spaltbarkeit des Esters wurde das Ergebnis der Bestimmung des Aminostickstoffs anfänglich als Widerspruch empfunden. Der Befund stellt aber nur eine Bestätigung der Ergebnisse bei der Spaltung des Esters in alkoholischer Lösung dar. Denn der gebundene Stickstoff wird nur vorgetäuscht, da auch der Stickstoff der Pyrrolidoncarbonsäure durch die Bestimmung nach van Slyke nicht erfaßt wird.

[2]) 2 Mol. Alkali auf 1 Mol. Peptidester.

[3]) Die hier einsetzende Entwicklung von Ammoniak kann nur auf einen Gehalt an noch nicht völlig entferntem Ammonchlorid (etwa 4,5%) zurückgeführt werden; denn weder aus Glutaminsäure noch Glycinester-chlorhydrat wird von 5%iger alkoholischer Kalilauge Ammoniak frei gemacht.

säure zugesetzt. Neben Kaliumchlorid schied sich noch Glycin aus, das durch Verestern der abfiltrierten Substanz mit alkoholischer Salzsäure als Äthylester-chlorhydrat isoliert wurde (1,3 g = 92%). Das im Vakuum eingedampfte alkoholische Filtrat hinterließ 1,1 g sirupöse Pyrrolidon-carbonsäure (85% der Theorie). Nach Anreiben mit Alkohol und langem Stehen konnten 0,1 g krystalline l-Pyrrolidon-carbonsäure (Schmelzp. 151—158°) isoliert werden.

39,67 mg Substanz gaben 3,82 ccm N (24°, 748 mm).

$C_5H_7O_3N$ Ber. N 10,85% Gef. N 10,89%

Weitere Mengen an krystallisierter Säure waren entsprechend den bekannten Erfahrungen[1]) über die Krystallisationsträgheit nicht ganz reiner Säure nicht zu gewinnen.

2. Mit alkoholischer Salzsäure: Zu einer Lösung von 3,15 g des Sirups in 25 ccm absolutem Alkohol wurde die berechnete Menge 7%iger alkoholischer Salzsäure gegeben und sofort weiter unter Umschwenken 250 ccm trockener Äther. Nach wenigen Sekunden begann die Krystallisation vom Chlorhydrat des Glycin-äthyl-esters; nach mehrstündigem Stehen war ein voluminöser Krystallbrei entstanden. Erhalten: 1,9 g Ester-chlorhydrat, das nach einmaligem Umkrystallisieren aus Alkohol rein war.

Die alkoholisch-ätherische Mutterlauge, die wegen der Unlöslichkeit von Glutaminsäure und auch Glutaminsäure-chlorhydrat in dem Gemisch nur Pyrrolidon-carbonsäure enthalten konnte, hinterließ nach dem Verjagen im Vakuum 1,5 g Sirup. Da auch nach mehrwöchentlichem Stehen keine Krystallisation zu erreichen war, wurde der Sirup durch Kochen mit konz. Salzsäure in das Chlorhydrat der Glutaminsäure überführt. Erhalten: 1,6 g (64,21% der Theorie). Schmelzp. 207° (Zersetzung).

**Verseifung des d,l-Pyrrolidonyl-glycin-äthylesters.[2])**

Entsprechend den Versuchsbedingungen beim d-Glutaminyl-glycin-ester 1. mit alkoholischem Kaliumhydroxyd: Nach dem Abtrennen von ausgefallenem Kaliumchlorid, Konzentrieren des alkoholischen Filtrats und Zusatz von absolutem Äther wurden 57% der Theorie an reinem d,l-Pyrrolidonyl-glycin, Schmelzp. 167 bis 168°, isoliert (nach E. Abderhalden Schmelzp. 165°). Aus der alkoholisch-ätherischen Mutterlauge krystallisierten nach

[1]) Vgl. z. B. Skola, Z. f. Zuckerind. d. čech. Rep. **46**, 351 (1920).

[2]) Dargestellt nach E. Abderhalden, Ber. chem. Ges. **43**, 2152 (1910).

längerem Stehen 18% des unveränderten Esters aus. Schmelzp. 132 bis 134°. Mischprobe mit dem Ausgangsmaterial: 131—134°. 2. Mit alkoholischer Salzsäure schied sich nach Zugabe von Äther das unveränderte Ausgangsmaterial fast quantitativ aus.

**Umsetzungen des l-Pyrrolidonyl-anilids.**

1. Mit α-Naphthyl-isocyanat: Das Anilid wurde mit etwa der 4fachen Menge des Isocyanats vermischt und unter Feuchtigkeitsausschluß über kleiner Flamme direkt erhitzt. Nach der fast momentan verlaufenden Reaktion erstarrte das Gemisch beim Abkühlen. Überschüssiges Isocyanat wurde mit Äther extrahiert und der Rückstand aus Alkohol umkrystallisiert. Weiße, feine Nadeln, die bei 240° noch nicht geschmolzen waren. Ausbeute fast theoretisch.

0,1194 g Substanz gaben 0,3095 g $CO_2$, 0,0637 g $H_2O$.
0,1048 g „ „ 10,2 ccm N (22,5°, 750 mm).

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| $C_{22}H_{19}O_3N_3$ | Ber. | C 70,75% | H 5,13% | N 11,26% |
| | Gef. | „ 70,69 | „ 5,97 | „ 11,10 |

2. Mit Phenyl-isocyanat wie unter 1: Aus Alkohol feine, glänzende Blättchen, Schmelzp. 204,5—205,5°.

36,58 mg Substanz gaben 90,04 mg $CO_2$, 16,9 mg $H_2O$.
34,57 mg „ „ 3,92 ccm N (23°, 755 mm).

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| $C_{18}H_{17}O_3N_3$ | Ber. | C 66,84% | H 5,30% | N 13,00% |
| | Gef. | „ 67,13 | „ 5,17 | „ 12,99. |

Vorliegende Arbeit wurde im Institut für organ. Chemie der Techn. Hochschule zu Breslau unter der Leitung von Herrn Privatdozenten Dr. phil. W. Voss ausgeführt.

Es sei mir gestattet, auch an dieser Stelle Herrn Dr. W. Voss für die Anregung zu dieser Arbeit und den mir jederzeit gern gewährten Rat während der Durchführung meinen herzlichsten Dank auszusprechen. Ferner erlaube ich mir, Herrn Prof. Dr. F. Straus für das mir stets bewiesene Interesse herzlichst zu danken.

# Lebenslauf

Ich, Renate Guttmann, wurde am 29. Nov. 1904 in Bolkenhain (Schlesien) als Tochter des Amtsrichters Benno Guttmann geboren. Ich besuchte das Reform-Realgymnasium der Staatl. Augusta-Schule zu Breslau und bestand Ostern 1924 die Reifeprüfung. Im Wintersemester 1924 begann ich an der Techn. Hochschule zu Breslau das Studium der Chemie. Im Mai 1927 bestand ich das Diplom-Vorexamen, im Dezember 1929 die Diplom-Hauptprüfung. Seitdem war ich mit der Anfertigung der vorliegenden Dissertation beschäftigt.

Meine akademischen Lehrer waren die Professoren O. Ruff, O. Lummer, B. Neumann, A. Eucken, F. Straus und F. Noether.